

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日            2 0 0 3 年    3 月 1 9 日  
Date of Application:

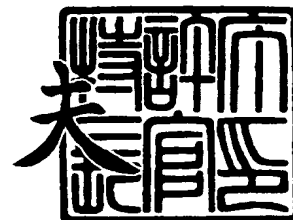
出 願 番 号            特 願 2 0 0 3 - 0 7 5 0 3 8  
Application Number:  
[ST. 10/C]:            [ J P 2 0 0 3 - 0 7 5 0 3 8 ]

出    願    人            富 士 写 真 フ イ ル ム 株 式 会 社  
Applicant(s):

2 0 0 3 年 1 0 月    6 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今 井 康 夫





【書類名】 特許願

【整理番号】 P27610J

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 G01N 37/00102  
G01N 33/53  
G01N 21/76  
G01N 33/543

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県南足柄市中沼 2 1 0 番地 富士写真フイルム株式会社内

【氏名】 中 寛 賢二

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県南足柄市中沼 2 1 0 番地 富士写真フイルム株式会社内

【氏名】 嘉藤 彰史

【特許出願人】

【識別番号】 000005201

【氏名又は名称】 富士写真フイルム株式会社

【代理人】

【識別番号】 100073184

【弁理士】

【氏名又は名称】 柳田 征史

【選任した代理人】

【識別番号】 100090468

【弁理士】

【氏名又は名称】 佐久間 剛

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 008969

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9814441

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 生化学解析用ユニット

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 複数の孔を有する基板と、前記複数の孔内に充填されて吸着性領域を形成する多孔性の吸着性材料とからなる生化学解析用ユニットにおいて、前記吸着性領域が、平均孔径が相対的に小さい孔を有する層と平均孔径が相対的に大きい孔を有する層とを備えていることを特徴とする生化学解析用ユニット。

【請求項 2】 前記基板の片面で前記吸着性領域を形成する前記層が繋がっており、前記基板の下層を通してある孔から該孔の隣の孔に向かうシグナルを吸収するシグナル吸収層が設けられていることを特徴とする請求項 1 記載の生化学解析用ユニット。

【請求項 3】 複数の孔を有する基板と、前記複数の孔内に充填されて吸着性領域を形成する多孔性の吸着性材料とからなる生化学解析用ユニットにおいて、前記吸着性領域が、該吸着性領域に結合されるリガンドまたはレセプタと結合可能な官能基が相対的に多い材料からなる層と、前記官能基が相対的に少ない材料からなる層とを備えていることを特徴とする生化学解析用ユニット。

【請求項 4】 前記基板の片面で前記吸着性領域を形成する前記層が繋がっており、前記基板の下層を通してある孔から該孔の隣の孔に向かうシグナルを吸収するシグナル吸収層が設けられていることを特徴とする請求項 3 記載の生化学解析用ユニット。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、レセプタまたはリガンドを標識物質を利用して検出するための生化学解析用ユニットに関するものである。

【0 0 0 2】

【従来の技術】

従来から臨床検査などの分野においては様々な検体についての分析が行われて

おり、これらの検体を短時間かつ正確に分析するために、各種の分析キット、分析機器に用いる分析用具が開発されている。例えば、特許第3298836号公報には、多孔質の検体導入部に平均孔径が分析部の平均孔径よりも大きくした検体分析用具が記載されている。これは、多孔質の検体導入部の平均孔径を大きく、分析部の平均孔径を小さくすることによって、検体の成分分離を行って検体をより短時間で処理することを可能としたものである。

#### 【0003】

また、遺伝子発現解析などの分子生物学の分野においては、メンブレン上にDNA等の生体高分子を含むスポット（ドット）が多数配置されて成るマクロアレイが知られている。このマクロアレイは1枚のメンブレン上において多数・多種類の試料を一度に解析することが可能であることから、分子生物学・医療分野で多用されている。例えば、種々のDNA断片（プローブ）をアレイ上にドット状に配置し、このアレイ上にmRNA等をもとにして調製したターゲットを加えてハイブリダイゼーション等を行うことによって、多数の遺伝子の挙動を一度に解析することが可能である。

#### 【0004】

従来のマクロアレイはニトロセルロース等の有機高分子メンブレンで構成されているため非常に柔軟であり、作業に支障をきたす折れ曲がりやしわが発生し易いため、膜状硬質多孔体に被検物質を含むスポットが多数配置されたマクロアレイが開発されている（特開2001-83164号公報）。

#### 【0005】

一方、マイクロアレイ解析システムやマクロアレイ解析システムにおいては、メンブレンフィルタなどの生化学解析用ユニットの表面の異なる位置に、ホルモン類、腫瘍マーカー、酵素、抗体、抗原、アプザイム、その他のタンパク質、核酸、cDNA、DNA、RNAなど、生体由来の物質と特異的に結合可能で、かつ、塩基配列や塩基の長さ、組成、特性などが既知のリガンドまたはレセプタを含む溶液を滴下して多数の吸着性領域を形成し、放射線標識物質、蛍光物質、化学発光基質と接触させることによって化学発光を生じさせる標識物質などによって標識されたレセプタまたはリガンド（ホルモン類、腫瘍マーカー、酵素、抗体

、抗原、アブザイム、その他のタンパク質、核酸、DNA、mRNAなどの抽出、単離などによって生体から採取された、あるいは、採取された後に化学的処理が施された物質）を、吸着性領域に含まれているリガンドまたはレセプタにハイブリダイズ等させてリガンドまたはレセプタと特異的に結合させ、多数の吸着性領域に選択的に含まれている放射性標識物質によって蓄積性蛍光体シートの輝尽性蛍光体層を露光し、露光された輝尽性蛍光体層を励起光によって走査して、輝尽性蛍光体層に含まれている輝尽性蛍光体を励起し、輝尽性蛍光体から放出された輝尽光を光電的に検出して生化学解析用データを生成し、あるいは、多数の吸着性領域を励起光によって走査して多数の吸着性領域に選択的に含まれている蛍光物質を励起し、蛍光物質から放出された蛍光を光電的に検出して生化学解析用データを生成し、あるいは、多数の吸着性領域に選択的に含まれている標識物質を化学発光基質と接触させ、標識物質から放出される化学発光を光電的に検出して生化学解析用データを生成するシステムが開発されている（特開 2 0 0 2 - 3 5 5 0 3 6 号公報）。

#### 【0 0 0 6】

これらのシステムによれば、生化学解析用ユニット上に数多くのリガンドまたはレセプタを結合した吸着性領域を高密度に形成して、標識物質によって標識されたレセプタまたはリガンドをハイブリダイズ等させることによって、短時間でレセプタまたはリガンドを解析することが可能になるという利点がある。

#### 【0 0 0 7】

##### 【特許文献 1】

特許第 3 2 9 8 8 3 6 号公報

#### 【0 0 0 8】

##### 【特許文献 2】

特開 2 0 0 1 - 8 3 1 6 4 号公報

#### 【0 0 0 9】

##### 【特許文献 3】

特開 2 0 0 2 - 3 5 5 0 3 6 号公報

#### 【0 0 1 0】

**【発明が解決しようとする課題】**

しかし、上記生化学解析用ユニットの吸着性領域に結合されるリガンドまたはレセプタは吸着性領域の全体に結合固定化されるため、検出面から遠い吸着性領域に固定化されたりリガンドまたはレセプタに結合したレセプタまたはリガンドからの信号（シグナル）が減衰するといった問題がある。上記マイクロアレイあるいはマクロアレイのシステムにおいても、より正確にレセプタまたはリガンドを解析できることが要求されており、信号の減衰は正確な生化学解析用データ生成の妨げの一因となる。

**【0011】**

本発明は上記事情に鑑みなされたものであり、レセプタまたはリガンドからの信号の減衰を抑制することが可能な生化学解析用ユニットを提供することを目的とするものである。

**【0012】**

なお、上記特許文献2には膜状硬質多孔体が、平均孔径が相対的に小さい貫通孔を有する表層部と平均孔径が相対的に大きい貫通孔を有する基層部とから構成されていることが記載されている。膜状硬質多孔体は、本発明の複数の孔を有する基板の孔内に多孔性の吸着性材料が充填されてなる生化学解析用ユニットとは明確に区別されるものであって、さらに、膜状硬質多孔体を平均孔径が相対的に小さい貫通孔を有する表層部と平均孔径が相対的に大きい貫通孔を有する基層部とから構成したのは、プローブを含む溶液をスポットする際に、溶液をより早く浸透させるためのものである点で異なるものである。

**【0013】****【課題を解決するための手段】**

本発明の生化学解析用ユニットは、複数の孔を有する基板と、前記複数の孔内に充填されて吸着性領域を形成する多孔性の吸着性材料とからなる生化学解析用ユニットにおいて、前記吸着性領域が、平均孔径が相対的に小さい孔を有する層と平均孔径が相対的に大きい孔を有する層とを備えていることを特徴とするものである。

前記孔径は、ある1つの孔における一番長い径と一番短い径との平均値を意味

する。相対的に小さい孔を有する層と相対的に大きい孔を有する層との平均孔径の差は、相対的に小さい孔を有する層と相対的に大きい孔を有する層のそれぞれの層厚などによって異なるため一概には言えないが、相対的に大きい孔を有する層の平均孔径を 1 とした場合、相対的に小さい孔を有する層の平均孔径は 0.7 以下であることが好ましく、より好ましくは 0.5 以下、さらには 0.4 以下であることが好ましい。

#### 【0014】

前記基板の片面で前記吸着性領域を形成する前記層が繋がっている場合には、前記基板の下層を通してある孔から該孔の隣の孔に向かうシグナルを吸収するシグナル吸収層が設けられていることが好ましい。

#### 【0015】

本発明の生化学解析用ユニットは、複数の孔を有する基板と、前記複数の孔内に充填されて吸着性領域を形成する多孔性の吸着性材料とからなる生化学解析用ユニットにおいて、前記吸着性領域が、該吸着性領域に結合されるリガンドまたはレセプタと結合可能な官能基が相対的に多い材料からなる層と、前記官能基が相対的に少ない材料からなる層とを備えていることを特徴とするものである。

#### 【0016】

吸着性領域に結合されるリガンドまたはレセプタと結合可能な官能基は、吸着性領域に結合されるリガンドまたはレセプタによって異なるが、例えば、カルボキシル基、アミノ基、紫外線照射によって結合可能となるアミド基、ケン化処理により結合可能となるエステル結合を形成する基、シランカップリング剤により結合が可能となる水酸基などがあげられる。

#### 【0017】

官能基が相対的に多い材料からなる層と官能基が相対的に少ない材料からなる層に含まれる官能基量の差は、官能基が相対的に多い材料からなる層と官能基が相対的に少ない材料からなる層のそれぞれの層厚や、官能基の種類などによって異なるため一概には言えないが、官能基が相対的に多い材料からなる層の官能基の密度を 1 とした場合、官能基が相対的に少ない材料からなる層に含まれる官能基の密度は 0.7 以下であることが好ましく、より好ましくは 0.5 以下、さら



には0.4以下であることが好ましい。

#### 【0018】

前記基板の片面で前記吸着性領域を形成する前記層が繋がっている場合には、前記基板の下層を通してある孔から該孔の隣の孔に向かうシグナルを吸収するシグナル吸収層が設けられていることが好ましい。

#### 【0019】

##### 【発明の効果】

本発明の生化学解析用ユニットは、複数の孔を有する基板と、複数の孔内に充填されて吸着性領域を形成する多孔性の吸着性材料とからなる生化学解析用ユニットにおいて、吸着性領域が、平均孔径が相対的に小さい孔を有する層と平均孔径が相対的に大きい孔を有する層とを備えているので、平均孔径が相対的に小さい孔を有する層は比表面積が大きいのでリガンドまたはレセプタを固定化させることができ、平均孔径が相対的に大きい孔を有する層は反応液を生化学解析用ユニット全体に均一に分配させるとともに、吸着性材料の自己保持性を向上させることができる。すなわち、吸着性領域の機能を、平均孔径が相対的に小さい孔を有する層と平均孔径が相対的に大きい孔を有する層のそれぞれに分担させることができる。

#### 【0020】

固定化されるリガンドまたはレセプタは平均孔径が相対的に小さい孔を有する層に集中するので、固定化されたリガンドまたはレセプタと特異的に結合したレセプタまたはリガンドを標識物質からの信号を利用して検出する際に、平均孔径が相対的に小さい孔を有する層側から検出すれば、レセプタまたはリガンドからの信号を減衰させることなく検出することが可能である。

#### 【0021】

また、本発明の生化学解析用ユニットは、複数の孔を有する基板と、複数の孔内に充填されて吸着性領域を形成する多孔性の吸着性材料とからなる生化学解析用ユニットにおいて、吸着性領域が、この吸着性領域に結合されるリガンドまたはレセプタと結合可能な官能基が相対的に多い材料からなる層と、官能基が相対的に少ない材料からなる層とを備えているので、官能基が相対的に多い材料から

なる層にはリガンドまたはレセプタを固定化させ、官能基が相対的に少ない材料からなる層には、反応液を生化学解析用ユニット全体に均一に分配させるとともに、吸着性材料の自己保持性を向上させ、加えてレセプタまたはリガンドが静電的相互作用や極性相互作用により非特異的に吸着することを防止させることができる。すなわち、吸着性領域の機能を官能基が相対的に多い材料からなる層と官能基が相対的に少ない材料からなる層のそれぞれに分担させることができる。

#### 【0022】

固定化されるリガンドまたはレセプタは官能基が相対的に多い材料からなる層に集中するので、固定化されたりガンドまたはレセプタと特異的に結合したレセプタまたはリガンドを標識物質からの信号を利用して検出する際に、官能基が相対的に多い材料からなる層側から検出すれば、レセプタまたはリガンドからの信号を減衰させることなく検出することが可能である。

#### 【0023】

なお、基板の下で吸着性領域を形成する層が繋がっている場合に、基板の下の層を通してある孔からこの孔の隣の孔に向かうシグナルを吸収するシグナル吸収層を設けることによって、ある孔で検出されるレセプタまたはリガンドからの信号が基板の下で繋がっている吸着性領域を形成する層を伝わって隣の孔に伝播することを効果的に抑制することができるため、本来、検出されるべきレセプタまたはリガンドからの信号のみを検出することが可能となり、それぞれの孔からのシグナルを正確に検出することが可能となる。

#### 【0024】

##### 【発明の実施の形態】

以下、図面を参照して本発明の実施の形態について説明する。図1は本発明の生化学解析用ユニットの概略斜視図である。図1に示す生化学解析用ユニット1は、孔3が複数設けられた基板2と、孔3の内部に充填され、多孔性材料が基板2と接着された吸着性領域4とからなる。

#### 【0025】

図2は本発明の生化学解析用ユニットの概略部分断面図である。図2に示すように、吸着性領域4は平均孔径が相対的に小さい孔を有する層4aと平均孔径が

相対的に大きい孔を有する層 4 b とから構成されており、平均孔径が相対的に大きい孔を有する層 4 b の下層には、基板 2 の下側部分 6 を通って孔 3 a から隣の孔 3 b に向かって伝播するシグナルを吸収するシグナル吸収層 5 が設けられている。基板 2 の下側部分 6 は、吸着性領域を形成する層 4 a と層 4 b とが繋がっており、基板 2 によって層 4 a、層 4 b およびシグナル吸収層 5 が圧縮された部分である。

#### 【 0 0 2 6 】

吸着性領域に固定されるリガンドまたはレセプタは、平均孔径が相対的に小さい孔を有する層 4 a に集中的に結合され、平均孔径が相対的に大きい孔を有する層 4 b には殆ど結合することがない。従って、この生化学解析用ユニットを用いてレセプタまたはリガンドを標識物質を利用して検出すると、レセプタまたはリガンドは平均孔径が相対的に小さい孔を有する層 4 a に集中するから、層 4 a 側からシグナルを検出すれば、レセプタまたはリガンドからのシグナルを減衰させることなく検出することが可能である。

#### 【 0 0 2 7 】

また、基板 2 の下側部分 6 で吸着性領域を形成する層 4 a と層 4 b とが繋がっている生化学解析用ユニットでは、孔 3 a から隣の孔 3 b に向かってシグナルが伝播するが、リガンドまたはレセプタは平均孔径が相対的に小さい孔を有する層 4 a に集中的に結合されているため、リガンドまたはレセプタが吸着性領域の全体に分散して結合している場合に比べて、この孔間を伝播するシグナル量を抑えることができる。加えて、シグナル吸収層 5 を設けることによって、孔 3 a から隣の孔 3 b に向かって伝播するシグナルを効果的に吸収することができるので、隣接する孔同士で互いの孔から伝播するシグナルの影響を最小限にすることができる。

#### 【 0 0 2 8 】

なお、図 2 では吸着性領域が、平均孔径が相対的に小さい孔を有する層 4 a と平均孔径が相対的に大きい孔を有する層 4 b の 2 層からなる場合を示しているが、吸着性領域の層は 2 層に限定されるものではなく、例えば、平均孔径が相対的に小さい孔を有する層 4 a と平均孔径が相対的に大きい孔を有する層 4 b との間

に、この 2 層の平均孔径の中間の平均孔径を有する層が形成されていてもよい。

#### 【 0 0 2 9 】

また、図 2 では、シグナル吸収層を基板の下側全面に設けた対応を示しているが、シグナル吸収層は層 4 a と層 4 b の間に設けても、孔 3 を塞ぐように層 4 b の直下のみに設けても、また、層 4 a、層 4 b およびシグナル吸収層 5 が圧縮された部分 6 のみに、またはその一部に、ある孔からこの孔の隣の孔に向かって伝播するシグナルを吸収する態様で設けてもよい。

#### 【 0 0 3 0 】

基板 2 の材質としては、生化学解析用ユニット内部での光の散乱を防止するために、放射線または光を透過させないか、減衰させる材質が好ましく、金属、セラミックが好ましい。また、孔を開ける加工が容易であるプラスチックを基板として用いる場合は、放射線または光をより一層減衰させるために、粒子をプラスチック内部に分散させることが好ましい。

#### 【 0 0 3 1 】

金属としては、銅、銀、金、亜鉛、鉛、アルミニウム、チタン、錫、クロム、鉄、ニッケル、コバルト、タンタルあるいは、ステンレス鋼や黄銅などの合金が好ましくあげられる。セラミックとしては、アルミナ、ジルコニア、マグネシア、石英などが好ましくあげられる。プラスチックとしては、ポリエチレンやポリプロピレンなどのポリオレフィン、ポリスチレン、ポリメチルメタクリレートなどのアクリル樹脂、ポリ塩化ビニル、ポリ塩化ビニリデン、ポリフッ化ビニリデン、ポリテトラフルオロエチレン、ポリクロロトリフルオロエチレン、ポリカーボネート、ポリエチレンナフタレートやポリエチレンテレフタレートなどのポリエステル、ナイロンー 6 やナイロンー 6, 6 などの脂肪族ポリアミド、ポリイミド、ポリスルホン、ポリフェニレンサルファイド、ポリジフェニルシロキサンなどのケイ素樹脂、ノボラックなどのフェノール樹脂、エポキシ樹脂、ポリウレタン、酢酸セルロースやニトロセルロースなどのセルロース類、ブタジエンスチレン共重合体などのコポリマー、さらにはプラスチックをブレンドしたものなどが好ましくあげられる。

#### 【 0 0 3 2 】

また、吸着性領域に結合されたりガンドまたはレセプタにレセプタまたはリガンドを特異的に結合させ、レセプタまたはリガンドを標識物質を利用して検出する場合、標識物質から発する放射線または光などが、基板の孔から基板壁を透過することを抑制するため、放射線または光などを減衰させるように、プラスチックに金属酸化物粒子やガラス繊維などを充填することが好ましい。金属酸化物粒子としては、二酸化ケイ素、アルミナ、二酸化チタン、酸化鉄、酸化銅などがあげられるが、必ずしもこれらに限定されるものではない。

#### 【0033】

ここで、放射線または光を減衰させる態様としては、標識物質から発せられる放射線または光が基板の孔から基板壁を透過して、隣接する孔に到達する強度が  $1/5$  以下となる態様が好ましく、さらに  $1/10$  以下となる態様が好ましい。

#### 【0034】

放射性標識物質からの電子線などの放射線を効果的に遮蔽するためには、基板 2 の平均密度は、一般には  $0.6 \text{ g/cm}^3$  以上であり、好ましくは  $1 \sim 2.0 \text{ g/cm}^3$  の範囲にあり、さらには  $2 \sim 1.0 \text{ g/cm}^3$  の範囲であることが好ましい。電子線の透過距離は密度に反比例するので、放射性物質が、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{33}\text{P}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{14}\text{C}$  などのような一般的な放射性同位元素 (RI) であれば、基板 2 の平均密度をこの範囲とすることにより、各孔 3 内に固定されることになる試料の RI からの電子線を基板 2 の隔壁で遮蔽して、電子線の透過、散乱による放射線画像の分解能の低下を防ぐことができる。

#### 【0035】

基板 2 の厚みは、一般には  $50 \sim 1000 \mu\text{m}$  の範囲であることが好ましく、 $100 \sim 500 \mu\text{m}$  の範囲であることがより好ましい。

#### 【0036】

基板 2 に開ける孔 3 の開口部の面積 (サイズ) は、孔 3 の密度を高めるために、一般には  $5 \text{ mm}^2$  未満であり、好ましくは  $1 \text{ mm}^2$  未満であり、 $0.3 \text{ mm}^2$  未満がより好ましく、さらには  $0.01 \text{ mm}^2$  未満であることが好ましい。そして、より好ましくは  $0.001 \text{ mm}^2$  以上であることが好ましい。

#### 【0037】

孔 3 のピッチ（隣接する二つの孔の中心から中心までの距離）は 0. 0 5 ~ 3 mm の範囲であることが好ましく、孔 3 の間隔（隣接する二つの孔の端部から端部までの最短距離）は、0. 0 1 ~ 1. 5 mm の範囲であることが好ましい。孔 3 の数（密度）は、一般には 1 0 個 /  $\text{cm}^2$  以上であり、好ましくは 1 0 0 個 /  $\text{cm}^2$  以上、より好ましくは 5 0 0 個 /  $\text{cm}^2$  以上、さらには 1 0 0 0 個 /  $\text{cm}^2$  以上であることが好ましい。そして、好ましくは 1 0 0 0 0 0 個 /  $\text{cm}^2$  以下、さらには 1 0 0 0 0 個 /  $\text{cm}^2$  以下であることが好ましい。なお、必ずしも、孔 3 は全て図 1 に示したように等間隔で設けられている必要はなく、幾つかのブロック（単位）に別れてブロック毎に複数の孔が設けられていてもよい。

#### 【 0 0 3 8 】

基板 2 に複数の孔 3 を開ける方法としては、ピンで打ち抜くパンチング、電極に高電圧をパルス状に印加して基板を揮発する放電加工、エッチング、レーザー照射などがあげられる。基板の材料が、金属材料またはプラスチック材料の場合は、基板の表面にコロナ放電またはプラズマ放電を施して接着剤を塗工した後、吸着性領域を形成するための多孔性材料をプレスなどの手段により貼り合わせることで生化学解析用ユニットが作製される。接着剤としては、スチレンブタジエンゴム、アクリロニトリルブタジエンゴムなどが好ましく用いられる。接着剤を塗工する方法としては、ロール塗布、ワイヤーバー塗布、ディップ塗布、ブレード塗布などが好ましくあげられる。また、基板に吸着性領域を形成するための多孔性材料をプレスする場合には、基板と吸着性領域を形成するための材料を、事前に 1 枚毎に分割してから間欠的にプレスしてもよいし、基板と吸着性領域を形成するための材料をそれぞれ長尺帯状としたものを 2 つのロール間に連続搬送してもよい。

#### 【 0 0 3 9 】

吸着性領域を形成する多孔性材料としては、多孔質材料あるいは繊維材料が好ましく使用される。また、多孔質材料と繊維材料とを併用して吸着性領域を形成することもできる。本発明において、吸着性領域を形成するために使用される多孔性材料は、有機材料、無機材料のいずれでもよく、有機 / 無機複合体であってもよい。

**【 0 0 4 0 】**

吸着性領域を形成するために使用される有機多孔質材料は、特に限定されるものではないが、活性炭などの炭素多孔質材料あるいはメンブレンフィルタを形成可能な多孔質材料が好ましく用いられる。メンブレンフィルタを形成可能な多孔質材料としては、溶媒に溶解可能なポリマーが好ましく用いられる。溶媒に溶解可能なポリマーとしては、セルロース誘導体（例えば、ニトロセルロース、再生セルロース、セルロースアセテート、酢酸セルロース、酪酸酢酸セルロースなど）、脂肪族ポリアミド類（例えば、ナイロン 6、ナイロン 6， 6、ナイロン 4， 1 0 など）、ポリオレフィン類（例えば、ポリエチレン、ポリプロピレンなど）、含塩素ポリマー類（例えば、ポリ塩化ビニル、ポリ塩化ビニリデンなど）、フッ素樹脂類（例えば、ポリフッ化ビニリデン、ポリテトラフルオライドなど）、ポリカーボネート、ポリスルホン、アルギン酸及びその誘導体（例えば、アルギン酸、アルギン酸カルシウム、アルギン酸／ポリリシンポリイオンコンプレックスなど）、コラーゲンなどがあげられ、これらポリマーの共重合体や複合体（混合体）も用いることができる。

**【 0 0 4 1 】**

また、吸着性領域を形成するための繊維材料としては、特に限定されるものではないが、好ましくは前述したセルロース誘導体類、脂肪族ポリアミド類などがあげられる。

**【 0 0 4 2 】**

吸着性領域を形成するために使用される無機多孔質材料は、特に限定されるものではないが、好ましくは、金属（例えば、白金、金、鉄、銀、ニッケル、アルミニウムなど）、金属等の酸化物（例えば、アルミナ、シリカ、チタニア、ゼオライトなど）、金属塩（例えば、ヒドロキシアパタイト、硫酸カルシウムなど）及びこれらの複合体などがあげられる。

**【 0 0 4 3 】**

上記吸着性領域を形成する多孔性材料を適宜選択して、平均孔径が相対的に小さい孔を有する層と平均孔径が相対的に大きい孔を有する層、あるいは吸着性領域に結合されるリガンドまたはレセプタと結合可能な官能基が相対的に多い材料

からなる層と官能基が相対的に少ない材料からなる層とを形成する。

#### 【0 0 4 4】

また、シグナル吸収層は、上記多孔性材料に光や放射線などのシグナルを吸収する物質を混合することによって形成が可能である。シグナルが化学発光や蛍光の場合にはこれらの光の波長を吸収する色素などを、また、シグナルが放射線の場合には、放射線遮蔽物質である鉛やタングステンなどの重金属の微粒子を混合することによって形成できる。

#### 【0 0 4 5】

吸着性領域を平均孔径が相対的に小さい孔を有する層と平均孔径が相対的に大きい孔を有する層とから、あるいは吸着性領域に結合されるリガンドまたはレセプタと結合可能な官能基が相対的に多い材料からなる層とそのような官能基が相対的に少ない材料からなる層とから構成するためには、異なる種類の多孔質材料を含有している溶液（以下、ドープという）を順次支持体上に流延または塗布後、多孔性膜のポリマーの貧溶媒、もしくは良溶媒と貧溶媒の混合液に浸漬した後、水洗乾燥するか、または異なる種類のドープをそれぞれ支持体上に流延または塗布後、徐々に乾燥することにより別途作製することによって作製することができる。

#### 【0 0 4 6】

図3は、本発明の生化学解析用ユニットを作製する一実施の形態を示す概略図である。図3に示す生化学解析用ユニットは、孔径が異なる2層の多孔性膜21と基板2とを重ね合わせてプレスし、基板2の孔3に多孔性膜21を圧入する方法により作製されるものである。プレスしても、孔3に圧入される部分の多孔性膜の孔の孔径は殆ど変化しない状態で孔に圧入することができる。

#### 【0 0 4 7】

図3(a)に示すように、孔3が形成された基板2と多孔性膜21を重ねて、プレスロール22とバックアップロール23の間に送り込みプレスすることにより、図3(b)に示すように基板2の孔3に多孔性膜21を圧入する。この場合、プレスロール22とバックアップロール23を加熱する方法などにより、多孔性膜21を軟化させてもよい。



## 【 0 0 4 8 】

なお、本発明の生化学解析用ユニットは、ドープを注入することによって作製してもよい。図 4 は、本発明の生化学解析用ユニットを作製する別の実施の形態を示す概略図である。連続的、もしくは間欠的に搬送されている基板 2 の上方に、ドープ 3 1, 3 3 を基板 2 の孔 3 に注入するディスペンサ 3 0, 3 2 が配置されている。なお、図 4 ではドープと層の形成の関連を明確にするため、ドープの内容物を形成される層に対応させて記載している。ディスペンサ 3 0 は各孔へ間欠的にドープ 3 1 を注入し、続いてディスペンサ 3 2 はドープ 3 1 が注入された上から各孔へ間欠的にドープ 3 3 を注入する。ドープ 3 1, 3 3 を注入した後、基板に温度と湿度が制御された風を一定風速で供給し、徐々に溶剤を揮発させることによって 2 つの異なる種類の層を形成することができる。

## 【 0 0 4 9 】

本発明の生化学解析用ユニットは、リガンドまたはレセプタが結合された複数の多孔性の吸着性領域を有する生化学解析用ユニットのリガンドまたはレセプタに、レセプタまたはリガンドが添加された反応液をレセプタまたはリガンドを特異的に結合させ、レセプタまたはリガンドを標識物質を利用して検出するアッセイ法に広く適用することができる。

## 【 0 0 5 0 】

1 つの態様として本発明の生化学解析用ユニットは、リガンドまたはレセプタが結合された複数の多孔性の吸着性領域を有する生化学解析用ユニットのリガンドまたはレセプタに、標識物質によって標識された標識レセプタまたは標識リガンドが添加された反応液をリガンドまたはレセプタに特異的に結合させ、標識レセプタまたは標識リガンドを検出するアッセイ法に適用することができる。

## 【 0 0 5 1 】

標識レセプタまたは標識リガンドは、多孔性の吸着性領域に結合されるリガンドまたはレセプタと特異的に結合するホルモン類、腫瘍マーカー、酵素、抗体、抗原、アブザイム、その他のタンパク質、核酸、DNA、mRNA などの抽出、単離などによって生体から採取された、あるいは、採取された後に化学的処理が施され、標識物質によって標識されたものである。

## 【0052】

標識物質としては、放射線標識物質、蛍光標識物質、化学発光基質と接触させることによって化学発光を生じさせる標識物質などがあげられ、標識物質そのものが放射線、発光、発色あるいは光を照射することによって蛍光を放出するものであっても、標識物質に何らかの化学物質を接触させて、標識物質によって化学物質が分解あるいは反応する等して発光、発色あるいは蛍光を放出するものであってもよい。前者の標識物質としては、放射線同位元素、発光物質にアクリジニウムエステル等、発色物質に金コロイド粒子等、蛍光物質にフルオレセイン等を用いることができる。また、後者の標識物質としては、酵素を用いることができ、例えばアルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、ルシフェラーゼ、ベータガラクトシダーゼなどの酵素を好ましく用いることができる。これらの酵素に、化学発光基質あるいは色素基質あるいは蛍光基質を接触させることによってそれぞれ、化学発光、発色、蛍光を放出する。

## 【0053】

化学発光基質としては、酵素がアルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、ルシフェラーゼである場合には、特に限定するものではないが、それぞれジオキセタン、ルミノール、ルシフェリンを用いることができる。また、色素基質としては、酵素がアルカリホスファターゼの場合にはパラニトロフェノールリン酸、酵素がペルオキシダーゼの場合には4-アミノアンチピリンとトリンダー試薬の組合せ、ジアミノベンチジン、テトラメチルベンチジン、酵素がベータガラクトシダーゼの場合にはパラニトロフェニル  $\beta$ -D-ガラクトシド等を用いることができる。蛍光基質としては、酵素がアルカリホスファターゼの場合4-メチルウンベリフェニルリン酸、酵素がペルオキシダーゼの場合には3-(4-ヒドロキシフェニル)-プロピオン酸、酵素がベータガラクトシダーゼの場合には、4-メチルウンベリフェニル  $\beta$ -D-ガラクトシド等を用いることができる。

## 【0054】

別の態様として、本発明の生化学解析用ユニットはリガンドまたはレセプタが結合された複数の多孔性の吸着性領域を有する生化学解析用ユニットのリガンドまたはレセプタに、レセプタまたはリガンドが添加された反応液を特異的に結合

させ、レセプタまたはリガンドを標識物質によって標識された標識体と特異的に結合させ、レセプタまたはリガンドを検出するアッセイ法にも利用することができる。

#### 【 0 0 5 5 】

これは、検出するレセプタまたはリガンドを、吸着性領域のリガンドまたはレセプタと標識体によって挟み込む、いわゆるサンドイッチ法と呼ばれる手法に適用したものである。ここでいう、レセプタまたはリガンドは、多孔性の吸着性領域に結合されるリガンドまたはレセプタと特異的に結合するホルモン類、腫瘍マーカー、酵素、抗体、抗原、アプザイム、その他のタンパク質、核酸、DNA、mRNAなどの抽出、単離などによって生体から採取された、あるいは、採取された後に化学的処理が施された物質である。

#### 【 0 0 5 6 】

標識物質によって標識された標識体とは、前述の標識物質によって標識され、レセプタまたはリガンドの反応部位に特異的に結合することができる抗原、抗体の他、ホルモン類、腫瘍マーカー、酵素、アプザイム、その他のタンパク質、核酸、cDNA、DNA、RNAなどであって、特性、組成、構造あるいは塩基配列や塩基の長さなどが既知のものを意味する。

#### 【 0 0 5 7 】

さらに別の態様として本発明の生化学解析用ユニットは、リガンドまたはレセプタが結合された複数の多孔性の吸着性領域を有する生化学解析用ユニットのリガンドまたはレセプタに、補助物質が結合された補助物質結合レセプタまたは補助物質結合リガンドが添加された反応液を補助物質結合レセプタまたは補助物質結合リガンドと特異的に結合させ、補助物質に特異的に結合可能な結合可能標識物質を補助物質結合レセプタまたは補助物質結合リガンドと特異的に結合させ、補助物質結合レセプタまたは補助物質結合リガンドを検出するアッセイ法にも利用することができる。

#### 【 0 0 5 8 】

補助物質は結合可能標識物質が結合する物質であって、ジゴキシゲニン、ビオチン、アビジン、フルオロセインなどの抗原、及びこれらの抗原に対する抗体な

どを好ましくあげることができる。また、ビオチンに対するアビジンのような生物学的結合パートナーであってもよい。結合可能標識物質は、補助物質に特異的に結合可能であって前述の標識物質によって標識された物質である。

#### 【0059】

次に、本発明の生化学解析用ユニットを利用した生化学解析として化学発光法を例にとって説明する。

本発明の生化学解析用ユニットを利用した化学発光法では、まず、吸着性領域を有する生化学解析用ユニットの吸着性領域にリガンドまたはレセプタを結合させる。生化学解析用ユニットの吸着性領域が、平均孔径が相対的に小さい孔を有する層と平均孔径が相対的に大きい孔を有する層とから構成されている場合には、平均孔径が相対的に小さい孔を有する層側からリガンドまたはレセプタを結合する。また、生化学解析用ユニットの吸着性領域が、リガンドまたはレセプタと結合可能な官能基が相対的に多い材料からなる層と、そのような官能基が相対的に少ない材料からなる層とから構成されている場合には、リガンドまたはレセプタと結合可能な官能基が相対的に多い材料からなる層側からリガンドまたはレセプタを結合する。リガンドまたはレセプタは吸着性領域に滴下した後、紫外線の照射などによって吸着性領域に固定する。

#### 【0060】

このように、平均孔径が相対的に小さい孔を有する層側あるいはリガンドまたはレセプタと結合可能な官能基が相対的に多い材料からなる層側から、リガンドまたはレセプタを結合させることによって、リガンドまたはレセプタは吸着性領域の平均孔径が相対的に小さい孔を有する層あるいはリガンドまたはレセプタと結合可能な官能基が相対的に多い材料からなる層に集中的に固定することができる。

#### 【0061】

次に、吸着性領域に結合されたりガンドまたはレセプタに標識レセプタまたは標識リガンドを特異的に結合させる。この特異結合に際しては、反応液を吸着性領域を横切るように強制的に流動させることが可能なリアクタを用いる。図5は反応液を強制的に流動させることが可能なリアクタの一の実施の形態を示す概略

断面図である。

#### 【 0 0 6 2 】

このリアクタは、反応容器 4 1 と溶液循環パイプ 4 2 とポンプ 4 3 とからなり、反応容器 4 1 は、生化学解析用ユニット 4 0 を保持するとともに液漏れを防止するシール機能を有する生化学解析用ユニット保持部 4 4 を有しており、反応容器本体 4 5 は、反応容器上半部 4 6 と反応容器下半部 4 7 とからなり、反応容器上半部 4 6 は反応容器本体 4 5 に取り外し可能に設けられており、生化学解析用ユニット 4 0 は反応容器上半部 4 6 を取り外すことによってセットすることができるように構成されている。また、反応容器下半部 4 7 の底壁には溶液が流通可能な溶液流入口 4 8 が形成され、反応容器上半部 4 6 の頂壁には同様に溶液が流通可能な溶液流出口 4 9 が形成されている。さらに流入口 4 8 および流出口 4 9 には、溶液循環パイプ 4 2 がそれぞれ取り外し可能に取り付けられている。リアクタは、ポンプ 4 3 によって溶液が流入口 4 8 から反応容器本体 4 5 に入り、生化学解析用ユニット 4 0 を通過した後、流出口 4 9 から出て、溶液循環パイプを通して循環するように構成されている。

#### 【 0 0 6 3 】

このリアクタに吸着性領域にリガンドまたはレセプタが結合された生化学解析用ユニット 4 0 を取り付け、反応容器 4 1 内に標識レセプタまたは標識リガンドが添加された反応液を入れ、ポンプを駆動させて吸着性領域を強制的に横切るように反応液を流動させれば標識レセプタまたは標識リガンドを吸着性領域に結合されているリガンドまたはレセプタと特異的に結合させることができる。生化学解析用ユニットは吸着性領域の一方の層側にリガンドまたはレセプタが集中しているが、強制的に流動する反応液の流動方向に対してどちらを向けて取り付けてもよい。

#### 【 0 0 6 4 】

なお、図 5 に示すリアクタはポンプによって反応液を一方方向に強制的に流動させるものであるが、例えば、ポンプの代わりにシリンジとピストンを設けて反応液が反応容器内で往復流動するように構成してもよい。さらに、反応液が生化学解析用ユニットの下から上（あるいは上から下）に通過するのみで、反応液が

循環しないタイプのリアクタを用いることも可能である。

【0065】

また、ここでは反応液を吸着性領域を横切るように強制的に流動させることが可能なりアクタを用いて特異的結合を行う場合を例にとって説明しているが、本発明の生化学解析用ユニットの使用はこれに限定されるものではなく、生化学解析用ユニットと反応液をハイブリダイゼーションバッグ内に入れ、ハイブリダイゼーションバッグに振動を加えて標識レセプタまたは標識リガンドを対流あるいは拡散によって移動させて特異的に結合させる、いわゆる振盪方式によって行ってもよい。

【0066】

但し、生化学解析用ユニットの吸着性領域が、平均孔径が相対的に小さい孔を有する層と平均孔径が相対的に大きい孔を有する層とから構成されている生化学解析用ユニットを、上記のような反応液を吸着性領域を横切るように強制的に流動させることが可能なりアクタに取り付けて反応を行うと、平均孔径が相対的に大きい孔を有する層では、反応液の圧力抵抗を小さくすることが可能となり、反応液の流動速度を高めることができるので、反応効率の向上が期待できる。

【0067】

生化学解析用ユニットの吸着性領域に結合されたりガンドまたはレセプタは、生化学解析用ユニットの吸着性領域の一方の層に集中しているので、吸着性領域に結合されたりガンドまたはレセプタに特異的に結合する標識レセプタまたは標識リガンドもまた、生化学解析用ユニットの吸着性領域の一方の層に集中して結合することになる。

【0068】

反応容器に取り付けた生化学解析用ユニットは、多孔性の吸着性領域に結合されているリガンドまたはレセプタに特異的に結合しなかった標識レセプタまたは標識リガンドを除去するために、吸着性領域にいわゆる洗浄液を強制的に流動させて洗浄することが好ましい。吸着性領域を洗浄液が強制的に流動するので、多孔性の吸着性領域に結合されているリガンドまたはレセプタに特異的に結合していない標識レセプタまたは標識リガンドを、効率的に剥離させ、除去することが

可能になり、洗浄効率を大幅に向上することができる。

#### 【0069】

なお、この洗浄工程は、後述する酵素標識抗体を吸着性領域を横切るように強制的に流動させて標識レセプタまたは標識リガンドと特異的に結合させた後、特異的に結合しなかった酵素標識抗体を除去する場合にも行うことが好ましい。これによって、標識レセプタまたは標識リガンドと特異的に結合していない酵素標識抗体を、効率的に剥離させ、除去することが可能になり、洗浄効率を大幅に向上することができる。

#### 【0070】

吸着性領域に結合したリガンドまたはレセプタに特異的に結合した標識レセプタまたは標識リガンドに酵素標識抗体を結合させる前に、酵素標識抗体に対するブロッキングバッファを吸着性領域を横切るように強制的に流動させて吸着性領域をブロッキングすることが好ましい。ブロッキングによって、酵素標識抗体が標識レセプタまたは標識リガンドの抗原とではなく、吸着性領域に直接結合することを防止することができる。

#### 【0071】

次に、酵素標識抗体を吸着性領域を横切るように強制的に流動させて標識レセプタまたは標識リガンドと特異的に結合させる。酵素標識抗体は、標識レセプタまたは標識リガンドの標識物質に対する抗体（標識レセプタまたは標識リガンドが抗体である場合には抗原）を酵素で標識したものである。

#### 【0072】

酵素標識抗体を標識レセプタまたは標識リガンドと特異的に結合させた後、吸着性領域に洗浄液を強制的に流動させて、標識レセプタまたは標識リガンドと結合しなかった酵素標識抗体を除去する。続いて化学発光基質を吸着性領域に送り込み、標識レセプタまたは標識リガンドと特異的に結合した酵素標識抗体に接触させる。

#### 【0073】

化学発光基質と酵素との接触によって各吸着性領域から可視光波長領域の化学発光を生ずるので、これを生化学解析用ユニットの吸着性領域に結合されたりガ

ンドまたはレセプタが集中している側から光電的に検出して生化学解析用画像データを生成すれば、標識物質からの信号を減衰させることなく標識レセプタまたは標識リガンドを検出、測定することができる。

以下に本発明を実施例によりさらに具体的に説明する。

#### 【0074】

##### 【実施例】

##### (実施例1)

大きさが50mm×50mm、厚み100 $\mu$ mのSUS304シート（基板材料シート）に、孔径0.3mmの開口部が円形の微細孔を、エッチングによって孔ピッチ0.45mmで2500個形成した。

#### 【0075】

次に、吸着性領域に充填する充填材料としてALDRICH社製の重合度が異なるナイロン6,6（以下、低重合度と高重合度という）を用意した。ギ酸52gに高重合度のナイロン6,6および低重合度のナイロン6,6をそれぞれ10gずつ溶解した2種類の溶液を準備した。溶液の粘度は、高重合度のナイロン6,6を溶解したものが6.25Pa·s、低重合度のナイロン6,6を溶解したものが0.94Pa·sであった。この2種類の溶液のそれぞれ85gあたりに純水15gを添加した。清浄なガラス板上に、まず低重合度のナイロン6,6溶液を一樣なウエット厚みになるように流延し、続いてこの上に高重合度のナイロン6,6溶液を一樣なウエット厚みになるように流延し、低重合度のナイロン6,6溶液のウエット厚みが300 $\mu$ m、高重合度のナイロン6,6溶液のウエット厚みが100 $\mu$ m、合計のウエット厚みが400 $\mu$ mとした。

#### 【0076】

ギ酸と純水の比が45:55のギ酸水溶液に浸漬し、細孔を形成させたのち乾燥した。膜断面の電子顕微鏡による観察から、低重合度のナイロン6,6溶液からはより大きな細孔（1 $\mu$ m程度）の層が、高重合度のナイロン6,6溶液からはより小さな細孔（0.4 $\mu$ m程度）の層（以下、細孔層という）が形成されていた。重層構造の膜の厚みは180 $\mu$ mであった。

#### 【0077】



上記の基板の片面に接着剤を塗工し、続いて基板の孔内部に入り込んだ接着剤を吸引除去した後、乾燥した。続いて、接着剤を塗工した面に上記重層構造の吸着性領域構成材料を圧入して貼り合わせた。圧入はカレンダー方式（片方のロール温度が150℃、もう一方のロール温度が50℃）により、圧力100kPa/cmで行った。

#### 【0078】

熱変性により1本鎖とした、濃度25ng/μlのpBR328-DNA溶液（ロッシュ社製）を上記で作製した生化学解析用ユニットの吸着性領域の細孔層側から10nlずつ滴下し、その後紫外線を照射（254nm、33mJ/cm<sup>2</sup>）して1本鎖のpBR328-DNAを固定した。

#### 【0079】

リン酸水素二ナトリウム（無水）71gを滅菌された純水800mlに溶解した後、リン酸を3～4ml添加してpHを7.2に調整し、さらに滅菌された純水を加えて総量を1000mlとして1Mのリン酸バッファを作製した。作製したリン酸バッファ50mlと滅菌された純水43mlにドデシル硫酸ナトリウム7gを添加し、加温しながら攪拌して溶解し、0.5MのEDTAを200μl添加してハイブリダイゼーション溶液を調整した。

#### 【0080】

ジゴキシゲニン（DIG）で標識された濃度5ng/μlのpBR328-DNA溶液（ロッシュ社製）をTEバッファ溶液（ニッポンジーン社製：10mMのTris-HClと1mMのEDTAの混合溶液）によって希釈し、DIGで標識されたpBR328-DNA溶液を熱変性して1本鎖とした後、上記ハイブリダイゼーション溶液により希釈して濃度を10pg/mlとなるようにDIG標識pBR328-DNAを含むハイブリダイゼーション反応液を調整した。

#### 【0081】

上記生化学解析用ユニットをハイブリダイゼーションバッグに入れ、バッグ内にハイブリダイゼーション反応液を10ml供給し、振盪方式により68℃で18時間ハイブリダイゼーション反応を行った。ハイブリダイゼーション反応後、洗浄液をバッグ内に供給して生化学解析用ユニットを洗浄した。

## 【0082】

洗浄バッファ（ロッシュ社製）を滅菌された純水で濃度が1／10となるように希釈して化学発光用の洗浄液を調製し、生化学解析用ユニットが収容されているバッグ内にこの洗浄液を供給し、5分間振盪した。続いて、滅菌された純水で濃度が1／10となるように希釈したマレイン酸バッファ（ロッシュ社製）を用いて、ブロッキングバッファ溶液（ロッシュ社製）を濃度が1／10となるように希釈した後、ポリエーテルスルホン製のフィルタ（ $\phi = 0.2 \mu\text{m}$ ）で濾過してブロッキング剤とした。これを洗浄液を廃棄した後のバッグ内に供給し、1時間振盪してブロッキング反応を行った。

## 【0083】

次に、アンチジゴキシゲニン-A P-コンジュゲイト（ロッシュ社製：アルカリホスファターゼ標識ジゴキシゲニン抗体）を、ポリビニリデンフルオライド製のフィルタ（ $\phi = 0.2 \mu\text{m}$ ）で遠心濾過後、上記のブロック剤で濃度が0.075 U／ml になるように希釈して酵素標識抗体溶液を調製した。ブロッキング剤を廃棄した後のバッグ内にこれを5 ml 供給し、1時間振盪して抗原抗体反応を行った。

## 【0084】

抗原抗体反応の完了後、上記化学発光用の洗浄液をバッグ内に供給して生化学解析用ユニットを洗浄した。生化学解析用ユニットを取り出して、化学発光基質である C D P - s t a r （C D P - star, read to use：ロッシュ株式会社製）を含む溶液と接触させて、生化学解析用ユニットの吸着性領域から放出される化学発光を生化学解析用ユニットの細孔層側から冷却 C C D カメラ（L A S 1 0 0 0：富士写真フィルム社製）によって光電的に検出しデジタル信号を生成した。

## 【0085】

（実施例2）

生化学解析用ユニットの吸着性領域を、低重合度のナイロン6，6溶液のウェット厚みが200  $\mu\text{m}$ 、高重合度のナイロン6，6溶液のウェット厚みが200  $\mu\text{m}$ 、合計のウェット厚みが400  $\mu\text{m}$ となるように形成した以外は実施例1と同様にして化学発光を行い、デジタル信号を生成した。

## 【0086】

## (実施例3)

生化学解析用ユニットの吸着性領域を、低重合度のナイロン6, 6溶液のウェット厚みが100  $\mu\text{m}$ 、高重合度のナイロン6, 6溶液のウェット厚みが300  $\mu\text{m}$ 、合計のウェット厚みが400  $\mu\text{m}$ となるように形成した以外は実施例1と同様にして化学発光を行い、デジタル信号を生成した。

## 【0087】

## (実施例4)

DIGで標識された濃度5 ng/ $\mu\text{l}$ のpBR328-DNA溶液をTEバッファ溶液によって希釈し、DIGで標識されたpBR328-DNA溶液を熱変性して1本鎖とした後、実施例1で作製したハイブリダイゼーション溶液により希釈して濃度を1 pg/mlとなるようにDIG標識pBR328-DNAを含むハイブリダイゼーション反応液を調整した。

## 【0088】

吸着性領域に1本鎖のpBR328-DNAが固定された実施例2で作製された生化学解析用ユニットを図5に示すリアクタの反応容器に収容し、反応容器内にハイブリダイゼーション反応液を4 ml 供給し、ポンプを駆動して68℃で18時間ハイブリダイゼーション反応を行った。ハイブリダイゼーション反応後、ポンプを駆動して生化学解析用ユニットの吸着性領域を洗浄した。

## 【0089】

次に、実施例1で調整した化学発光用の洗浄液を生化学解析用ユニットが収容されている反応容器内に供給し、5分間ポンプを駆動して生化学解析用ユニットの吸着性領域を化学発光用の洗浄液に置換した。続いて、洗浄液を廃棄した後の反応容器内に実施例1で作製したブロッキング剤を供給し、ポンプを10分間駆動し生化学解析用ユニットの吸着性領域の隅々までブロッキング剤に置換後、ポンプを停止し50分間静置した。

## 【0090】

続いて、実施例1で作製した酵素標識抗体溶液を、ブロッキング剤を廃棄した後の反応容器内に5 ml 供給し、ポンプを1分間駆動した後、生化学解析用ユニ

ットの吸着性領域の隅々まで酵素標識抗体溶液に置換後、ポンプを停止し1時間静置した。

#### 【0091】

抗原抗体反応の完了後、上記洗浄バッファを反応容器内に供給してポンプを駆動して生化学解析用ユニットを洗浄した。続いて、化学発光基質であるCDP-star (CDP-star, read to use: ロッシュ社製) をポンプを駆動して生化学解析用ユニットの吸着性領域に接触させて、生化学解析用ユニットの吸着性領域から放出される化学発光を細孔層側から冷却CCDカメラ (LAS1000: 富士写真フイルム社製) によって光電的に検出しデジタル信号を生成した。

#### 【0092】

(比較例1)

実施例1で用いた高重合度のナイロン6, 6を実施例1と同様に溶液とし、清浄なガラス板上に、ウェット厚みが400 $\mu$ mとなるように一様に流延し、これによって吸着性領域を構成した以外は実施例1と同様にして生化学解析用ユニットを作製し、実施例1と同様に化学発光を行いデジタル信号を生成した。

#### 【0093】

(比較例2)

実施例1で用いた低重合度のナイロン6, 6を実施例1と同様に溶液とし、清浄なガラス板上に、ウェット厚みが400 $\mu$ mとなるように一様に流延し、これによって吸着性領域を構成した以外は実施例1と同様にして生化学解析用ユニットを作製し、実施例1と同様に化学発光を行いデジタル信号を生成した。

#### 【0094】

(比較例3)

比較例1で作製した生化学解析用ユニットを用い、実施例4と同様に図5に示すリアクタを用いて化学発光を行いデジタル信号を生成した。

#### 【0095】

実施例1～実施例3と比較例1および比較例2の生化学解析用ユニットにおける、シグナル、バックグラウンドの発光量およびS/N比を表1に示す。

#### 【0096】

【表 1】

	低重合度ナイロン 6.6のWel厚み( $\mu\text{m}$ )	高重合度ナイロン 6.6のWel厚み( $\mu\text{m}$ )	信号	バック グラウンド	S/N比
実施例 1	300	100	547300	8600	63.6
実施例 2	200	200	466800	6600	70.7
実施例 3	100	300	437300	6900	63.4
比較例 1	なし	400	378400	11500	32.9
比較例 2	400	なし	351100	23000	15.3

## 【0097】

表 1 から明らかなように、吸着性領域が平均孔径が相対的に小さい孔を有する層と平均孔径が相対的に大きい孔を有する層とから構成されている本発明の生化学解析用ユニットでは、いずれの場合も吸着性領域が同じ大きさの細孔から形成されている比較例に比べて、デジタル信号は大きく、バックグラウンドは小さく検出された。実施例の生化学解析用ユニットは、吸着性領域に固定されている pBR328-DNA (リガンドまたはレセプタ) が、細孔層 (平均孔径が相対的に小さい孔を有する層) に集中しており、これに特異的に結合した DIG 標識 pBR328-DNA (レセプタまたはリガンド) も細孔層に集中するため、DIG 標識 pBR328-DNA に結合させたアルカリホスファターゼ標識ジゴキシゲニン抗体を CDP-star に接触させて得られる化学発光も、細孔層に集中し、これを細孔層側から検出するため信号を減衰させることなく検出することができたものである。

## 【0098】

また、実施例 1～3 の生化学解析用ユニットは基板の下で吸着性領域を形成する層が繋がっており、基板の下の層を通してある孔からこの孔の隣の孔に信号が伝播するが、吸着性領域に固定されている pBR328-DNA は細孔層に集中的に結合されているため、pBR328-DNA が吸着性領域の全体に分散して結合している比較例の生化学解析用ユニットに比べてこの孔間を伝播するシグナル量を抑えることができたため、バックグラウンドを小さくすることができた。

## 【0099】

次に、実施例 4 と比較例 3 の生化学解析用ユニットにおける、シグナル、バック

クグラウンドの発光量およびS／N比を表2に示す。

【0100】

【表2】

	低重合度ナイロン 6.6のWel厚み(μm)	高重合度ナイロン 6.6のWel厚み(μm)	信号	バック グラウンド	S/N比
実施例4	200	200	259120	6320	41
比較例3	なし	400	263500	10540	25

【0101】

実施例4と比較例3は、共に図5に示すような反応液を強制的に吸着性領域を横切らせるように流動させるリアクタを用いて化学発光を行ったものであるが、この場合も表2に示すように、吸着性領域が平均孔径が相対的に小さい孔を有する層と平均孔径が相対的に大きい孔を有する層とから構成されている本発明の生化学解析用ユニットの場合の方が、吸着性領域が同じ大きさの細孔から形成されている比較例に比べて、デジタル信号は大きく、バックグラウンドは小さく検出された。

【0102】

なお、本実施例では吸着性領域が平均孔径が相対的に小さい孔を有する層と平均孔径が相対的に大きい孔を有する層とを備えている生化学解析用ユニットについて示したが、吸着性領域が吸着性領域に結合されるリガンドまたはレセプタと結合可能な官能基が相対的に多い材料からなる層と官能基が相対的に少ない材料からなる層とを備えている生化学解析用ユニットでも、同様の効果が得られる。

【図面の簡単な説明】

【図1】

本発明の生化学解析用ユニットの概略斜視図

【図2】

本発明の生化学解析用ユニットの概略部分断面図

【図3】

本発明の生化学解析用ユニットを作製する一実施の形態を示す概略図

【図4】

本発明の生化学解析用ユニットを作製する別の実施の形態を示す概略図

【図 5】

反応液を強制的に流動させるリアクタの一の実施の形態を示す概略断面図

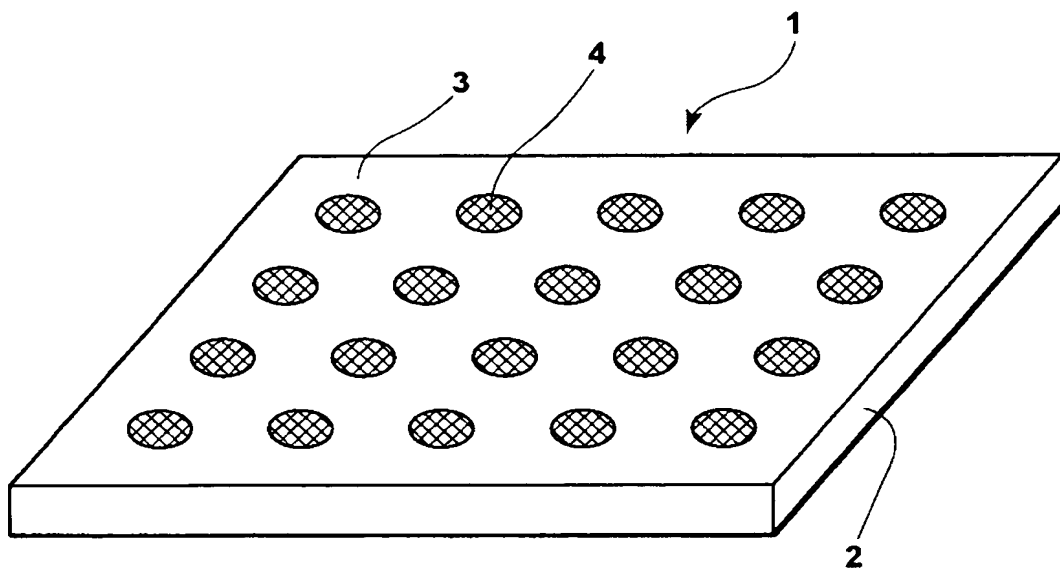
【符号の説明】

- 1 生化学解析用ユニット
- 2 基板
- 3 孔
- 4 吸着性領域
  - 4 a 平均孔径が相対的に小さい孔を有する層
  - 4 b 平均孔径が相対的に大きい孔を有する層
- 5 シグナル吸収層

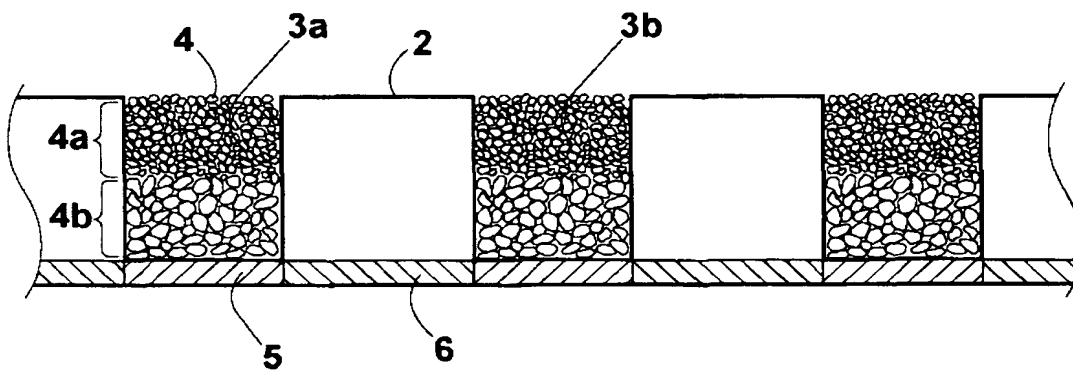
【書類名】

図面

【図 1】

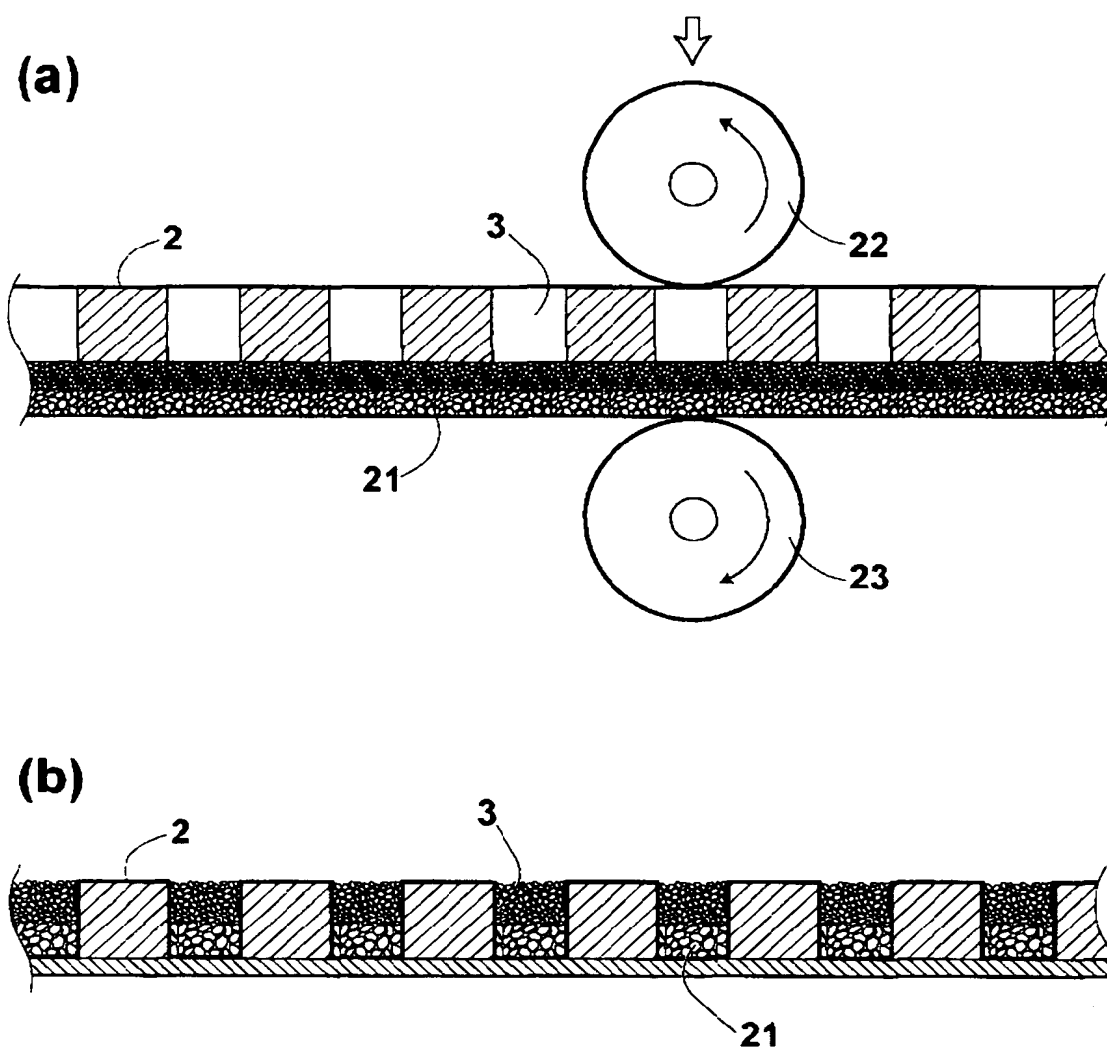


【図 2】

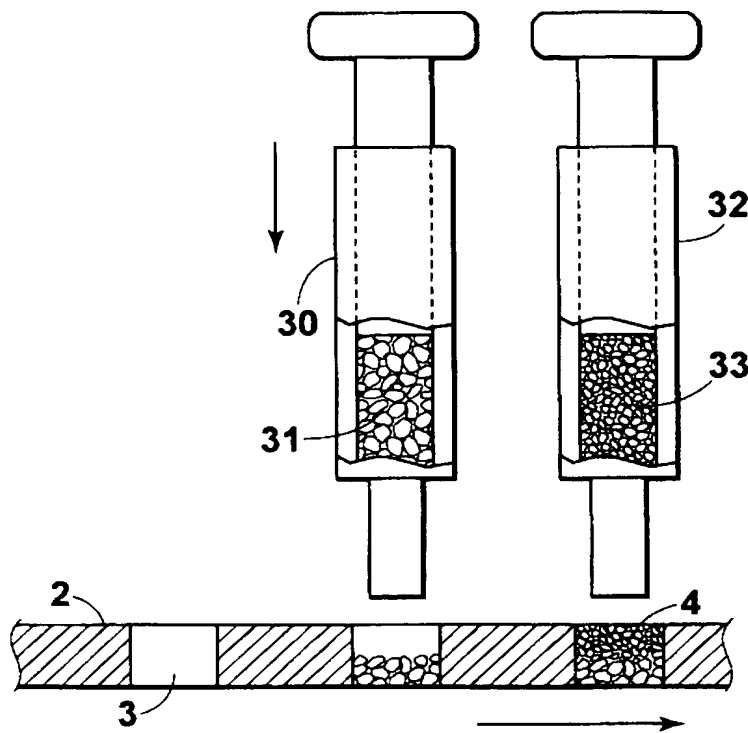




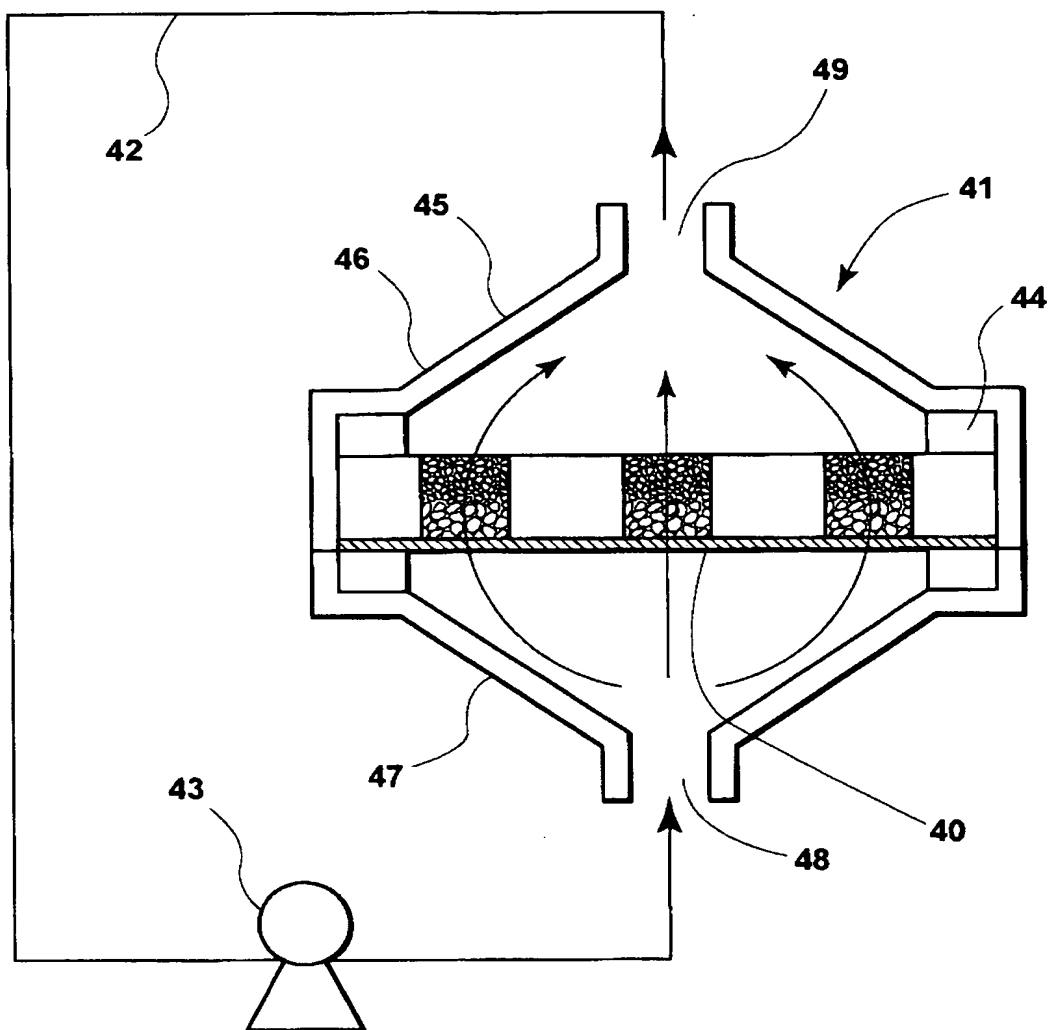
【図 3】



【図 4】



【図 5】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 生化学解析用ユニットを、レセプタまたはリガンドからの信号の減衰を抑制するものとする。

【解決手段】 複数の孔 3 を有する基板 2 と、この複数の孔 3 内に充填されて吸着性領域 4 を形成する多孔性の吸着性材料とからなる生化学解析用ユニット 1 の吸着性領域 4 を、平均孔径が相対的に小さい孔を有する層 4 a と平均孔径が相対的に大きい孔を有する層 4 b とを備えるものとする。

【選択図】 図 2

## 認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2 0 0 3 - 0 7 5 0 3 8
受付番号	5 0 3 0 0 4 4 6 9 8 0
書類名	特許願
担当官	第一担当上席 0 0 9 0
作成日	平成 1 5 年 4 月 1 日

## &lt; 認定情報・付加情報 &gt;

【提出日】 平成15年 3月19日

## 【特許出願人】

【識別番号】 000005201

【住所又は居所】 神奈川県南足柄市中沼 2 1 0 番地

【氏名又は名称】 富士写真フイルム株式会社

## 【代理人】 申請人

【識別番号】 100073184

【住所又は居所】 神奈川県横浜市港北区新横浜 3 - 1 8 - 3 新横浜 K S ビル 7 階

【氏名又は名称】 柳田 征史

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100090468

【住所又は居所】 神奈川県横浜市港北区新横浜 3 - 1 8 - 3 新横浜 K S ビル 7 階

【氏名又は名称】 佐久間 剛

次頁無

特願 2 0 0 3 - 0 7 5 0 3 8

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 0 0 0 0 0 5 2 0 1 ]

1. 変更年月日

1 9 9 0 年 8 月 1 4 日

[変更理由]

新規登録

住 所

神奈川県南足柄市中沼 2 1 0 番地

氏 名

富士写真フイルム株式会社